



Faculdade De Medicina Da Universidade De Lisboa

Mestrado Integrado em Medicina

Clínica Universitária de Medicina II

TRABALHO FINAL DE MESTRADO

Relação entre o refluxo gastro-esofágico e a asma no adulto: *Mecanismos Fisiopatológicos*

Aluna: Anabela Filipa Barreto da Silva

Orientador: Dr. João Madeira Lopes

2015/2016

Abstract

Epidemiological studies have shown a link between gastro esophageal reflux disease and asthma. Most of the evidence available has defended the existence of two main pathophysiological mechanisms behind this relationship, the vagal reflex theory and the microaspiration theory. Both consider the existence of neurogenic inflammation with release of tachykinins. Non-acid reflux should be considered, as well as the role of the various components of the gastric contents that include acid, pepsin, pancreatic enzymes, bile salts and microbial components, although their role isn't clearly defined yet. In addition, others factors characteristic of asthma patients may favor the occurrence of acid reflux such as autonomic dysregulation, increased transdiaphragmatic pressure gradient, medication for asthma control and hiatus hernia.

Resumo

Os estudos epidemiológicos têm demonstrado uma ligação entre a doença de refluxo gastro-esofágico e a asma. A maioria da evidência disponível tem defendido a existência de dois mecanismos fisiopatológicos principais subjacentes a esta relação, a teoria do reflexo vagal e a teoria da microaspiração. Ambas consideram a existência da inflamação neurogénica com libertação de taquicininas. O refluxo não ácido deve ser considerado, assim como o papel dos diversos componentes do conteúdo gástrico que incluem ácido, pepsina, enzimas pancreáticas, sais biliares e componentes microbianos, embora o seu papel ainda não se encontre completamente definido. Além disso, outros factores característicos dos doentes asmáticos poderão favorecer a ocorrência de refluxo como a desregulação autonómica, o aumento do gradiente de pressão transdiafragmático, o uso de medicação para controlo da asma e a hérnia do hiato.

Índice

Introdução	4
Método.....	7
Mecanismos Fisiopatológicos	8
Teoria do Reflexo Vagal.....	8
Teoria da Microaspiração	12
Modificação do Sistema Imunitário.....	14
Papel do refluxo não ácido na asma.....	17
Asma como causa de refluxo gastro-esofágico.....	20
Conclusão	23
Referências Bibliográficas.....	25

Introdução

Segundo o relatório *Global Strategy for Asthma Management and Prevention* da *Global Initiative for Asthma*, a asma é uma doença heterogénea, caracterizada pela inflamação crónica das vias aéreas. É definida por sintomas respiratórios como pieira, dispneia, opressão torácica e tosse que variam ao longo do tempo e em intensidade, associados a limitação do fluxo das vias aéreas.¹ A asma é uma das doenças crónicas mais comuns, estimando-se que cerca de 300 milhões de pessoas no mundo são afectadas.² No que concerne à população portuguesa, os resultados de um estudo recentemente realizado apontam para a existência de cerca de 695 mil asmáticos, isto é, 6.8% da população.³ Vários factores têm sido apontados como responsáveis pelo início da resposta inflamatória que domina a doença, nomeadamente o refluxo gastro-esofágico (RGE), considerado um factor frequentemente associado a exacerbações recorrentes em doentes com asma de difícil controlo^{4,5} e uma comorbilidade major em adultos asmáticos.^{6,7}

O RGE é um fenómeno que se caracteriza pela passagem de conteúdo gástrico para o esófago, na ausência de vômito, um evento fisiológico quando assintomático e de pequena duração. Contudo, segundo a classificação de Montreal, deve ser considerada uma nova entidade, a doença do refluxo gastro-esofágico (DRGE) que consiste numa condição que se desenvolve quando o refluxo do conteúdo do estômago provoca sintomas e/ou complicações.⁸ À semelhança da asma, a DRGE é uma doença muito prevalente em diferentes partes do mundo, afectando cerca de 10 a 20% da população da Europa Ocidental e América do Norte.⁸ Em Portugal, segundo dados recentes do Observatório Nacional de Saúde, esta doença apresenta uma prevalência de cerca de 35% na população com mais de 18 anos.⁹

Em 1892 foi descrita pela primeira vez a existência de uma possível associação entre a asma e a DRGE, quando Sir William Osler refere que “*severe paroxysms of asthma may be induced by overloading the stomach, or by taking certain articles of food*”.¹⁰ Vários estudos, recorrendo a questionários relativos a sintomas como pirose ou regurgitação, mostraram que 25.4 a 80% dos doentes asmáticos adultos podem apresentar sintomas de DRGE e que a sua prevalência e gravidade são superiores neste grupo comparativamente aos indivíduos saudáveis.^{11,12,13,14,15,16} Além disso, constatou-se que 36 a 75% dos doentes asmáticos relacionam sintomas respiratórios com sintomas típicos e atípicos de DRGE.^{11,16,17} Por outro lado, demonstrou-se que o RGE determinado

objectivamente através da pHmetria 24 horas é igualmente muito prevalente entre a população de doentes asmáticos^{13,14,18} e que em 80% dos casos, estão associados sintomas respiratórios com eventos de refluxo ácido documentado por pHmetria.¹⁵ Contudo, o RGE assintomático parece assumir igualmente um papel importante neste grupo de doentes, encontrando-se presente em 9.6 a 62% dos doentes asmáticos adultos^{5,13,15,17,19}, tendo-se verificado que a sua gravidade não é menor do que aquela encontrada em doentes asmáticos com RGE sintomático.¹⁹ A discrepância entre os resultados dos trabalhos publicados no que diz respeito à prevalência da DRGE parece evidente, sendo esta resultante da aplicação de diferentes definições da DRGE e asma. Enquanto uns autores consideram a existência de sintomas como condição necessária à existência de refluxo, outros recorrem a parâmetros objectivos.

Contudo, independentemente das limitações apresentadas pelos estudos, é inegável o aumento da prevalência de DRGE em doentes asmáticos. De destacar que num estudo recente o RGE foi considerado mais prevalente em doentes adultos com asma não alérgica do que em doentes com asma alérgica e estes resultados foram consistentes com o desenvolvimento da doença numa idade mais tardia.²⁰ Além disso, outros estudos demonstraram que doentes com refluxo referiam sintomas como pieira, dispneia em repouso e dispneia nocturna 2 a 3 vezes mais, comparativamente às pessoas sem sintomas de refluxo^{21,22}, tendo-se concluído que os doentes com RGE nocturno persistente apresentavam um risco aumentado de desenvolver asma de novo e outros sintomas respiratórios comparativamente aos indivíduos sem queixas de RGE nocturno.²³

Em conclusão, vários estudos apontam para uma possível relação causal entre o RGE e a asma, nomeadamente em adultos.

Por outro lado, alguns ensaios clínicos vieram demonstrar o potencial benefício da utilização de inibidores da bomba de prótons na melhoria da função pulmonar, número de exacerbações de asma, sintomas pulmonares e melhoria da qualidade de vida, embora tal ainda não se encontre totalmente estabelecido.^{5,24,25,26,27} A explicação para este facto poderá dever-se novamente às definições utilizadas pelos autores quanto à DRGE e à asma, assim como ao limitado número de doentes utilizados nos ensaios, dificuldades na medida de exacerbações, qualidade de vida, doses utilizadas dos fármacos e duração do *follow-up*. Contrariamente, no que concerne ao tratamento cirúrgico, os estudos são praticamente unânimes, mostrando resultados favoráveis quanto à melhoria dos sintomas respiratórios, redução do uso da medicação para o controlo da asma, óxido nítrico exalado

e resistência das vias aéreas^{28,29,30,31}, o que vem corroborar a hipótese de uma relação causal entre estas duas patologias.

Apesar de inúmeras publicações apontarem de forma consistente para uma associação entre as duas patologias, persistem dúvidas quanto aos mecanismos através dos quais o RGE pode provocar inflamação das vias aéreas em doentes asmáticos. Assim, a revisão da literatura que se segue tem como objectivo fazer uma análise crítica de toda a evidência disponível que explora os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à relação entre a DRGE e a asma.

Método

A revisão da literatura que se segue foi elaborada através da pesquisa sistemática de artigos com recurso à base de dados PubMed, utilizando as seguintes palavras chave “*gastroesophageal reflux*”, “*reflux*”, “*GERD*”, “*proton-pump inhibitor*”, “*antireflux therapy*”, “*acid reflux*”, “*bile acids*”, “*bile salts*”, “*pepsin*”, “*gastric fluid*”, “*asthma*”, “*airway hyperresponsiveness*” e “*pathophysiology*”, tendo sido seleccionados artigos desde 1969. Numa primeira pesquisa obtiveram-se 574 artigos. Foram apenas seleccionados artigos escritos em inglês ou em português e segundo a espécie e idade (humanos adultos e animais), daí resultando a análise de 207 artigos, que foram seleccionados segundo o título e *abstract*, tendo em conta a sua pertinência para o objectivo do estudo. De referir que apenas artigos originais foram escolhidos para leitura integral. O esquema da Fig. 1 retrata toda a linha de pesquisa.

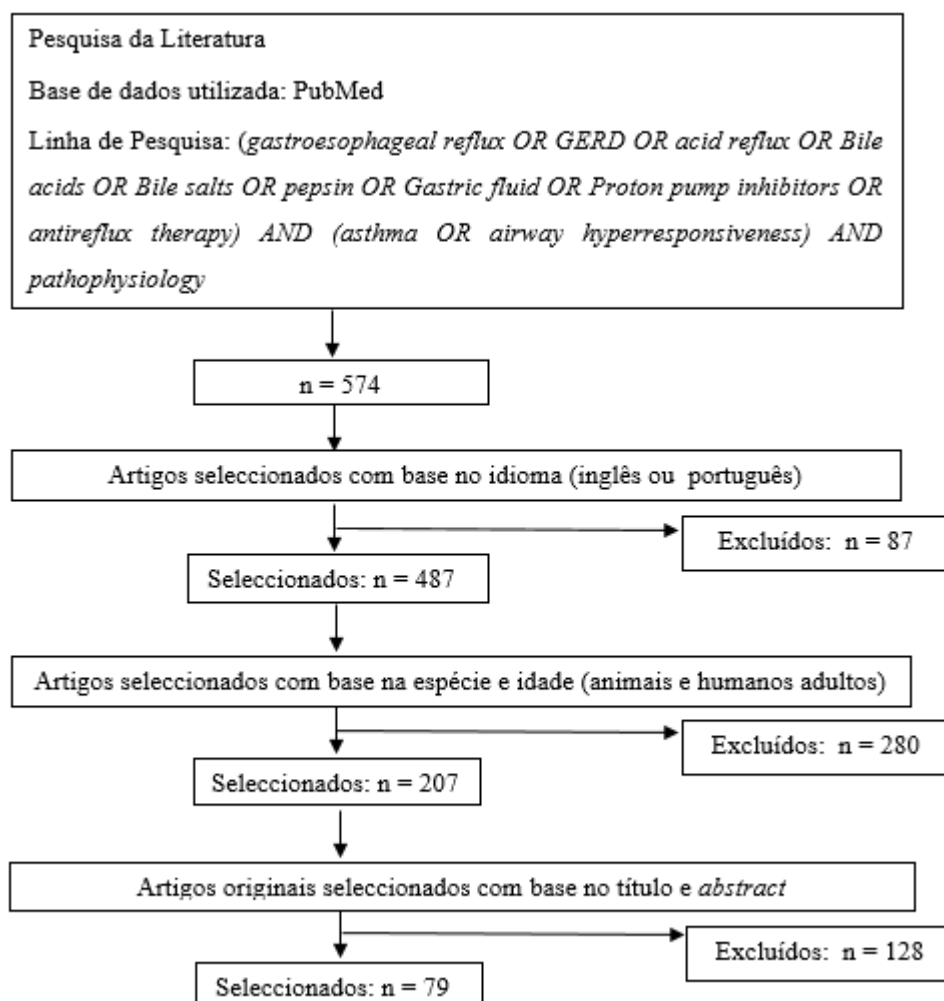


Fig 1. Método

Mecanismos Fisiopatológicos

Segundo vários autores a DRGE poderá desencadear asma através de dois mecanismos principais: um indirecto, a teoria do reflexo vagal e outro directo, a teoria da microaspiração (Fig. 2).

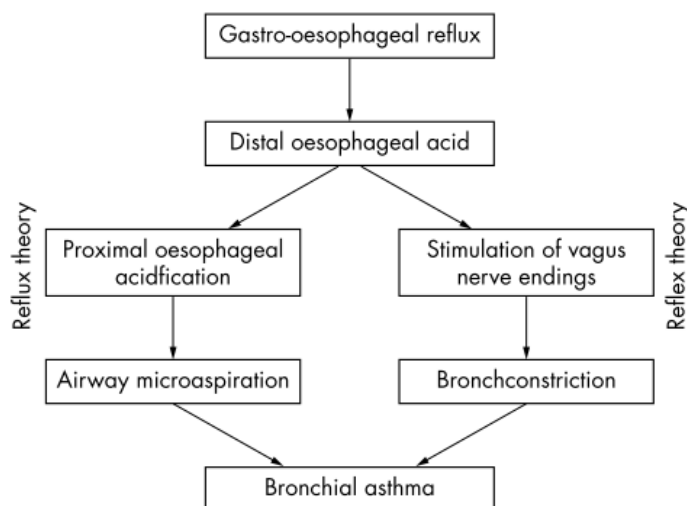


Fig. 2 Mecanismos fisiopatológicos principais subjacentes à associação entre a asma e a DRGE

Teoria do Reflexo Vagal

Através de um estudo realizado por Vincent *et al*, verificou-se que em doentes asmáticos existia uma correlação positiva entre a queda de 20% do valor basal do *Forced expiratory volume in 1 second* (FEV₁) causada pelo teste de provocação com metacolina e o número de episódios de refluxo (>15) na pHmetria 24 horas¹⁸, sugerindo que a exposição esofágica ao ácido aumentava a reactividade brônquica. Por outro lado, comprovou-se que em doentes asmáticos adultos, a reactividade brônquica avaliada através da prova de provocação com metacolina e a resistência específica das vias aéreas se encontravam alteradas durante a perfusão esofágica de ácido clorídrico comparativamente à perfusão salina, sem registo de alterações no pH proximal do esófago durante a perfusão do ácido.^{32,33} Recentemente, Amarasiri *et al* mostraram que, de uma forma geral, os doentes asmáticos apresentavam um aumento significativo da actividade parassimpática e da resposta broncoconstritora quando sujeitos a perfusão esofágica de

ácido comparativamente à salina.³⁴ Além disso, a diminuição do *Peak Expiratory Flow* (PEF) e o aumento da resistência das vias aéreas em doentes com asma e esofagite grave não foram observados quando estes foram tratados previamente com atropina antes de uma nova instilação de ácido, sugerindo uma intervenção vagal no mecanismo subjacente.^{35,36} Contudo, num estudo recente os autores não encontraram qualquer relação entre a instilação esofágica de ácido e a reactividade brônquica avaliada através do teste de provocação com bradicinina, não se tendo verificado igualmente alterações no pH no esfíncter esofágico superior.³⁷

Através de estudos em animais, demonstrou-se que a instilação de ácido no esófago era responsável por um aumento da resistência das vias aéreas e extravasamento microvascular de plasma e que esses efeitos eram revertidos pela vagotomia bilateral ou com a administração de atropina.^{38,39,40,41} Além disso, foi comprovado o envolvimento dos receptores muscarínicos, nomeadamente M1 e M3, no extravasamento microvascular de plasma nas vias aéreas assim como na broncoconstrição induzidos pela instilação intra-esofágica de ácido clorídrico em cobaias, verificando-se a reversão destes fenómenos após o tratamento com os seus antagonistas, atropina (antagonista muscarínico não específico), pirenzepina (antagonista selectivo dos receptores M1) e 4-difenilmetoxi-N-metilpiperidina metiodeto, 4-DAMP (antagonista selectivo dos receptores M3)⁴¹, o que sugere a libertação de acetilcolina das terminações do nervo vago. Note-se que a estimulação de receptores muscarínicos, particularmente o M3, foi associada à libertação de mediadores pro-inflamatórios envolvidos no recrutamento de neutrófilos como interleucina (IL) 8 e leucotrienos B4 pelas células musculares lisas, células epiteliais e macrófagos alveolares.⁴² De modo semelhante, verificou-se recentemente que a remodelação das vias aéreas, a infiltração pulmonar de células inflamatórias e o aumento da reactividade brônquica à acetilcolina causada pela instilação intra-esofágica diária de ácido clorídrico, pode ser parcialmente, ou até mesmo totalmente, impedida através da utilização de antagonistas dos receptores muscarínicos, nomeadamente o tiotrópio, um anticolinérgico de longa acção.⁴³

Após a activação de neurónios sensoriais aferentes do esófago pelo ácido, é estimulada uma subpopulação de neurónios que se encontram no núcleo do trato solitário, localizado no bulbo e, por sua vez, estes sinais são integrados e subsequentemente excitam os neurónios motores das vias respiratórias do núcleo ambíguo e do núcleo dorsal motor do nervo vago, produzindo uma resposta defensiva parassimpática eferente (ex. broncoconstrição) após activação dos nervos colinérgicos pós-ganglionares, constituindo

o **reflexo vagal central** (Fig. 3 e Fig. 4).⁴⁴ Contudo, alguns autores acreditam que, dada a origem embriológica comum entre o esófago e o sistema respiratório, estes terão a mesma inervação e, sendo assim, quando o esófago é estimulado com ácido gástrico poderá ocorrer a modulação da excitabilidade dos neurónios eferentes parassimpáticos através de uma via axonal directa entre o esófago e as vias respiratórias e pulmões, gerando-se o **reflexo local esofago-traqueo-brônquico** e consequentemente broncoconstrição (Fig. 3).^{39,45,46} Neste sentido, Hamamoto *et al*, através de uma investigação realizada em animais, demonstraram que substâncias como as taquicininas são libertadas nas vias respiratórias das cobaias quando ocorre estimulação intra-esofágica por ácido clorídrico. Além disso, concluíram que existe comunicação entre o esófago e as vias respiratórias que inclui o nervo vago, comprovada pela inibição deste fenómeno nos animais que sofreram vagotomia bilateral. De referir ainda que, ao tratarem os animais previamente com atropina e propranolol, os autores tentaram bloquear tanto as vias adrenérgicas como colinérgicas, tendo obtido resultados curiosos. O extravasamento do plasma nas vias respiratórias ocorreu mesmo após este procedimento, o que significa que poderão estar envolvidas vias não adrenérgicas e não colinérgicas, que contêm neuropéptidos como as taquicininas, e que a sua activação evoca o reflexo “axonal” e consequentemente a inflamação neurogénica.³⁹ A inflamação neurogénica foi igualmente sugerida pelo estudo realizado por Patterson *et al*, o qual veio demonstrar que os níveis de taquicininas (substância P e neuroquinina A) existentes na expectoração dos doentes asmáticos com refluxo concomitante são mais elevados, comparativamente àqueles sem refluxo. Além disso, foi observada uma correlação significativamente positiva entre a exposição ácida do esófago e os níveis de taquicininas nos doentes asmáticos, ao contrário dos doentes não asmáticos.⁴⁷

Foi comprovado que um aumento da concentração de iões de hidrogénio poderá activar nociceptores denominados vanilóides, existentes em neurónios sensoriais primários sensíveis à capsaicina, assim designados pela capacidade de serem estimulados por um ingrediente contido numa variedade de pimentas vermelhas do género *Capsicum*.⁴⁴ Estes neurónios, que pertencem a uma subpopulação de neurónios de fibras não mielinizadas do tipo A^δ e C e contêm neuropéptidos, poderão fazer a comunicação entre o esófago e as vias respiratórias.^{46,48,49} Esta interacção causa a abertura de canais iónicos e despolariza a membrana celular, aumentando a taxa de libertação de substância P e neuroquinina A nas terminações dos neurónios sensoriais, causando a maioria dos sinais inflamatórios (inflamação neurogénica) através da activação do receptores NK1 e

NK2 existentes nas células epiteliais, endoteliais, musculares lisas, mesenquimatosas e inflamatórias,⁴⁴ nomeadamente os eosinófilos que são recrutados e activados pelas taquicininas através do receptor NK1.⁵⁰ Outros modelos animais mostraram igualmente que o extravasamento microvascular de plasma nas vias aéreas induzido pela instilação intra-esofágica de ácido clorídrico se encontra dependente de taquicininas, embora o envolvimento do receptor NK3 seja ainda controverso.^{40,49} Demonstrou-se ainda que as taquicininas potenciam a neurotransmissão colinérgica nas terminações nervosas pós-ganglionares, nomeadamente através do receptor NK2.⁵¹

Assim, ao confirmar-se o papel que o nervo vago desempenha na fisiopatologia subjacente à relação entre a DRGE e a asma, poderá atribuir-se maior importância à utilização de anticolinérgicos, nomeadamente antagonistas dos receptores muscarínicos, que poderão melhorar as manifestações pulmonares decorrentes da DRGE, mas também inibir a secreção de ácido clorídrico, assim como os seus efeitos na transmissão nervosa colinérgica no gânglio autonómico e consequentemente os seus efeitos na árvore traqueobrônquica. Novos fármacos poderão ainda ser desenvolvidos, nomeadamente antagonistas das taquicininas ou análogos da peptidase, enzima que provoca a sua degradação.

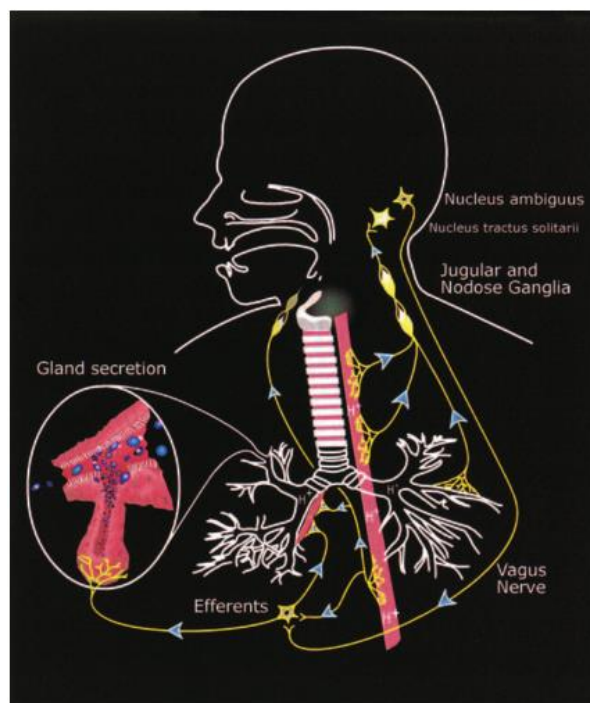


Fig. 3 Reflexo esofago-traqueo-brônquico

Teoria da Microaspiração

A teoria da microaspiração considera que o conteúdo gástrico pode refluir para a via aérea superior, causando broncospasmo e edema da mucosa. Este fenómeno foi observado em estudos animais quando se instilou ácido nas vias respiratórias.⁵² Com o objectivo de testar a hipótese, Jack *et al* realizaram uma técnica que envolve a medição directa e simultânea do pH traqueal e esofágico em 4 doentes asmáticos e 3 indivíduos aparentemente saudáveis (grupo controlo). Ao longo de 24 horas registaram 37 episódios de RGE com duração superior a 5 minutos no primeiro grupo. Destes 37 episódios, 5 foram seguidos por uma diminuição do pH traqueal de uma média de 7.1 para 4.1, acompanhada de uma descida média do PEF de 84 L/min. Quando o RGE ocorria sem aspiração traqueal a queda no PEF foi de apenas 8 L/min.⁵³ Resultados contrários foram evidenciados por Schan *et al* num estudo prospectivo, onde 47 adultos foram divididos em quatro grupos: 20 asmáticos com refluxo, 7 asmáticos sem refluxo, 10 doentes com RGE sem asma e 10 indivíduos pertencentes ao grupo controlo (sem asma e sem refluxo). Foram realizadas na posição vertical, infusões intra-esofágicas de solução salina seguidas de ácido clorídrico, com perfusão posterior de solução salina. O PEF diminuiu nos quatro grupos com infusão do ácido, incluindo, portanto, o grupo controlo, não estando este resultado dependente de refluxo proximal.⁵⁴ A partir deste estudo, poder-se-ia pensar que o decúbito dorsal seria uma condição necessária à ocorrência de microaspiração. Contudo, um ano mais tarde Harding *et al* demonstraram o contrário ao revelar que mesmo nessa posição a diminuição do PEF após a infusão de ácido clorídrico não se encontra correlacionada com a exposição ácida proximal do esófago.³² É importante ainda ressaltar que a ausência de alterações no PEF não implica necessariamente ausência de microaspiração.

A favor da teoria da microaspiração está ainda a elevada prevalência de alterações na pHmetria no esófago proximal nos doentes asmáticos,⁵⁵ aparentemente uma condição necessária para a existência de microaspiração. Dos 242 doentes com asma mal controlada com sintomas de RGE mínimos ou ausentes que foram submetidos a pHmetria 24 horas com sonda dupla (proximal e distal) por DiMango *et al*, 38% apresentavam refluxo proximal.⁵⁶ Contudo, não foi observada uma correlação significativa entre o FEV₁ e uma pHmetria positiva no esófago distal e proximal.¹³ Além disso, um estudo recentemente publicado mostrou que dos 27 doentes com asma de início na idade adulta e com sintomas típicos ou atípicos de DRGE que foram submetidos por Komatsu *et al* a

impedanciometria intraluminal multicanal hipofaríngea, 41% tinham evidência objectiva de DRGE e 70% dos doentes apresentavam exposição esofágica proximal anormal, apesar da existência de pHmetria negativa.³¹

De referir ainda que, à semelhança do que acontece com o reflexo vagal, se comprovou que a exposição directa das vias aéreas a soluções ácidas estimula as terminações dos neurónios sensoriais sensíveis à capsaicina localizadas entre as células epiteliais da mucosa brônquica, provocando inflamação neurogénica e consequentemente broncoconstrição.⁵⁷ (Fig. 4) Demonstrou-se que a bradicinina, um péptido pro-inflamatório formado num microambiente com pH baixo e indutor de broncoconstrição através da libertação de taquicininas, se encontra envolvida na broncoconstrição provocada pela inalação de ácido cítrico.⁵⁸ Note-se que quando são bloqueados receptores das taquicininas NK1 e NK2 com antagonistas existe uma marcada diminuição da broncoconstrição quando o ácido cítrico é inalado, sugerindo deste modo que os prótons induzem broncoconstrição através da libertação de neuropeptídeos.⁵⁸ O estudo realizado em cobaias por Ricciardolo *et al* vem ainda demonstrar que a broncoconstrição provocada pela inalação de ácido cítrico não se encontra dependente de vias colinérgicas.⁵⁸ Contudo, recentemente, através de estudos em animais verificou-se que o ambiente ácido crónico nas vias aéreas promove *up-regulation* dos receptores M3, assim como aumento da expressão de canais de cálcio dependente de voltagem do tipo L nas células musculares lisas das vias aéreas⁵⁹ que, ao serem estimulados provocam broncoconstrição, contribuindo ainda para a remodelação das vias aéreas, característica da cronicidade da asma. Portanto, a inflamação neurogénica poderá ocorrer tanto através do reflexo vagal como através da microaspiração.

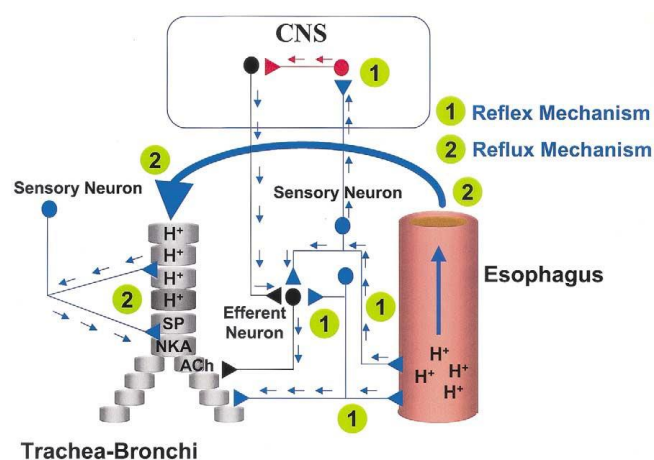


Fig 4. (1) Reflexo vagal central; Reflexo local esofago-traqueo-brônquico.
(2) Microaspiração de refluxo ácido.

Modificação do Sistema Imunitário

Apesar das teorias do reflexo vagal e da microaspiração incorporarem os mecanismos mais aceites pela comunidade científica para explicar a relação fisiopatológica entre a DRGE e a asma, recentemente tem sido enfatizado o papel do RGE na resposta do sistema imunitário.

A presença de eosinofilia na expectoração de doentes asmáticos, nomeadamente com asma de difícil controlo, tem sido consistente na maioria dos estudos ao longo do tempo.⁶⁰ Neste sentido, a inflamação das vias aéreas e a hiperreactividade brônquica que caracterizam a doença têm sido consideradas como resultantes da infiltração e desgranulação eosinofílica, a qual provoca a libertação de factores pro-inflamatórios e produtos citotóxicos, que por sua vez causam secreção de muco e dano tecidual.⁶¹ Por outro lado, a regulação da activação, crescimento, sobrevivência e função dos eosinófilos encontra-se dependente da IL-5, uma citocina patogénica secretada principalmente por células Th2.⁶² Outros estudos têm ainda demonstrado o papel preponderante da acção directa da IL-4 e IL-13, citocinas igualmente secretadas por células Th2, no epitélio e no músculo liso das vias aéreas dos doentes asmáticos, assim como na remodelação das vias aéreas após a exposição a alérgenos, facilitando ainda a entrada dos eosinófilos nos locais de inflamação (Fig. 5).^{63,64,65}

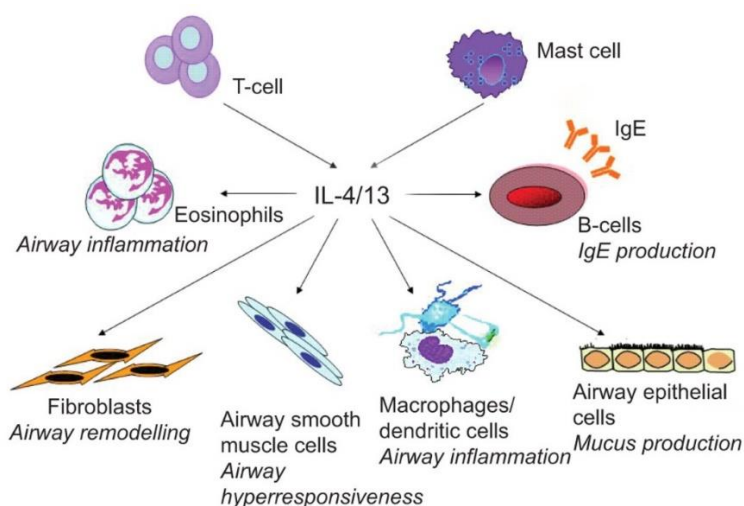


Fig. 5 Diagrama esquemático dos potenciais efeitos celulares da IL-4/IL-13 nas células inflamatórias e estruturais na asma.

A partir da análise celular da expectoração e da concentração de interleucinas no condensado do ar expirado de 14 doentes com asma associada a RGE, 9 com asma persistente, 8 com RGE e 17 indivíduos saudáveis, verificou-se que o primeiro grupo apresentava maior número de eosinófilos, assim como maior concentração de IL-4, comparativamente ao grupo de doentes apenas com RGE. Por outro lado, os doentes deste último grupo apresentavam um padrão inflamatório predominantemente neutrofílico com aumento da concentração de IL-6. Ambos os grupos com RGE demonstraram um aumento do stress oxidativo, determinado através da medição de 8-isoprostano. Contudo, a proporção de eosinófilos e neutrófilos existente na expectoração e a concentração de mediadores correlacionados no condensado de ar expirado não diferiu significativamente entre o grupo de doentes asmáticos com e sem RGE⁶⁶, o que indica que o RGE não agrava a inflamação preexistente em doentes asmáticos.

Sugawa *et al* verificaram que um grupo de ratinhos com esofagite de refluxo e asma apresentava concentrações de IL-13 e eosinófilos no lavado broncoalveolar em concentrações superiores comparativamente ao grupo de ratinhos com asma e sem esofagite de refluxo e que estas observações melhoravam com a administração de inibidores da bomba de prótons.⁶⁷ Tal demonstra que o RGE, especialmente o ácido clorídrico, participa na patogénese da asma, nomeadamente à custa da resposta Th2.

Contudo, recentemente alguns autores mostraram que cobaias perfundidas com ácido clorídrico intra-esofágico com microaspiração subsequente, de forma continuada, apresentavam um aumento do número de leucócitos no lavado broncoalveolar, nomeadamente neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos, assim como um aumento da concentração de IL-4, IL-5, IL-13 e *Transforming Necrosis Factor* α (TNF- α) comparativamente com os controlos. De notar que no primeiro grupo amostras do tecido pulmonar revelaram ainda evidência de hiperplasia e espessamento da matriz do epitélio colunar ciliar, congestão vascular, maior infiltrado eosinofílico, aumento da produção de muco, aumento da fibrose peribrônquica e espessamento do músculo liso das vias aéreas, esta última característica partilhada pela remodelação das vias aéreas dos doentes asmáticos.^{59,68} No estudo de Cheng *et al* destaca-se ainda que o aumento da hiperreactividade das vias aéreas se relaciona com o aumento das citocinas, sugerindo que a hiperreactividade brônquica resulta do desequilíbrio das citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) e Th1 (TNF- α).⁵⁹

Pelo contrário, Barbas *et al* demonstraram, através de um estudo realizado em ratinhos, que a aspiração crónica de suco gástrico resulta na infiltração de neutrófilos,

hipertrofia e hiperplasia da membrana basal brônquica, assim como num aumento de IL-12 no lavado broncoalveolar e da resposta Th2, determinada através da alteração do rácio IgG1:IgG2⁶⁹, uma resposta semelhante àquela observada em doentes asmáticos, apesar da ausência de eosinófilos. Note-se que a IL-12 é uma citocina pro-inflamatória que é essencial na iniciação e apresentação de antígenos às células T pelas células dendríticas e que tipicamente desempenha um papel fundamental na reorientação para um padrão de resposta Th1.⁷⁰ Por essa razão estes autores admitem o possível envolvimento das células Th1 à semelhança de Cheng *et al.*

Resultados distintos foram obtidos noutros estudos. Appel *et al* verificaram um aumento de macrófagos e células T, assim como um acréscimo predominante da concentração de *Transforming Growth Factor* β (TGF- β), TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-2 na amostra de lavado broncoalveolar em ratinhos submetidos a instilação pulmonar crónica de suco gástrico, comparativamente àqueles instilados com solução salina. De notar que a quantidade de citocinas produzidas por células Th1 foi predominante comparativamente com as citocinas Th2, como IL-4, IL-6 e IL-10.⁷¹ Os autores defendem portanto que eventos repetidos de aspiração de suco gástrico poderão resultar numa resposta inicial durante a qual os macrófagos libertam TGF- β , TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , podendo conduzir ao desenvolvimento de doenças pulmonares, nomeadamente a asma. Outro estudo semelhante demonstrou por um lado que a aspiração pulmonar continuada de conteúdo gástrico em ratinhos resultava num aumento de TNF- α e IL-12 associadas a macrófagos/monócitos e por outro numa diminuição de citocinas associadas a células T como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-23, assim como diminuição de interferão γ . De referir que a diminuição da IL-5, em particular, induzida pela aspiração foi apenas encontrada em ratinhos com hipersensibilidade das vias respiratórias e não nos ratinhos controlo sem hipersensibilidade.⁷² Estes resultados indicam que a aspiração crónica de suco gástrico poderá ter um efeito importante na resposta inflamatória a alérgenos aerossolizados.

Além disso, Zhu *et al* mostraram que os ratinhos com asma alérgica apresentavam maior concentração de IL-5 e mais eosinófilos no lavado broncoalveolar do que os ratinhos com asma induzida pelo refluxo.⁷³ Alguns autores têm portanto defendido a hipótese da asma associada a RGE constituir um fenótipo diferente da asma alérgica com padrões inflamatórios distintos.^{73,74} Assim, a maioria dos estudos têm demonstrado que a acumulação de eosinófilos, mastócitos e linfócitos Th2 é predominante na mucosa brônquica de doentes com asma alérgica, enquanto a acumulação de neutrófilos e

mastócitos tem sido descrita como característica fenotípica da asma não alérgica, nomeadamente asma associada a RGE.^{73,74,75} De facto, o efeito repetitivo da microaspiração de conteúdo gastroduodenal em modelos animais tem revelado alterações histopatológicas pulmonares com infiltração neutrofílica e células gigantes, hiperplasia de células caliciformes, aumento dos vasos sanguíneos, espessamento do músculo liso nas vias aéreas e aumento da fibrose.^{71,76} Além disso, verificou-se que 16 ratinhos, 24 horas após terem sido submetidos a infusão de ácido clorídrico no estômago apresentavam um padrão inflamatório nas vias aéreas predominantemente neutrofílico, assim como um aumento de IL-5, IL-6 e IL-8 no lavado broncoalveolar.⁷⁷ A infiltração celular nos tecidos pulmonares, nomeadamente macrófagos, linfócitos e neutrófilos, assim como o aumento de IL-8 e *Intercellular Adhesion Molecule 1* no lavado broncoalveolar de ratinhos submetidos a instilação crónica intra-esofágica de ácido clorídrico foram igualmente demonstrados por Cui *et al.*⁴³ Outro aspecto que parece ser distinto entre os dois fenótipos de asma parece relacionar-se com a remodelação das vias aéreas. Isto é, ao comparar doentes asmáticos com a mesma gravidade e duração da doença, o espessamento da membrana basal parece ser mais pronunciado nos doentes com asma alérgica relativamente aqueles com asma associada a RGE, o que sugere que a agressão inflamatória neste segundo fenótipo será menor.⁷⁴ O doseamento da IL-5 no lavado broncoalveolar e a análise do padrão celular predominante poderão portanto ser uma forma de distinção entre os dois fenótipos.⁷³

Papel do refluxo não ácido na asma

A maioria dos estudos que avalia a relação entre a DRGE e a asma tem-se focado no refluxo ácido. Contudo, a elevada prevalência de DRGE em doentes asmáticos e a discrepância dos estudos quanto à eficácia da terapêutica médica com antagonistas dos receptores H₂ e inibidores da bomba de prótons nos sintomas, qualidade de vida e função pulmonar dos doentes asmáticos^{25,26,78,79}, poderá levar-nos a pensar na influência de outros mecanismos que não envolvam a produção de ácido. Por outro lado, a melhoria de sintomas respiratórios após cirurgia por fundoplicação e outros tratamentos cirúrgicos anti-refluxo indirectamente apoia a ideia de que o refluxo não ácido poderá estar envolvido na patogénese da DRGE na asma.^{28,30,31,80} Komatsu *et al* e Tutuian *et al* através da combinação da impedanciometria intraluminal multicanal e da pHmetria demonstraram a existência de refluxo não ácido em doentes com sintomas respiratórios,

nomeadamente em doentes com asma de início na idade adulta e tosse persistente, apesar da terapêutica com inibidores da bomba de protões.^{31,81} Por outro lado, recentemente verificou-se que as células epiteliais brônquicas de doentes com sintomas de refluxo e sintomas respiratórios associados sob terapêutica com inibidores da bomba de protões apresentavam um aumento da produção de IL-8 em resposta à exposição ao conteúdo gástrico. Isto é, a aspiração de conteúdo gástrico, mesmo em doentes tratados com inibidores da bomba de protões pode ser responsável pelo desenvolvimento de uma resposta inflamatória pulmonar, tendo-se verificado uma correlação positiva entre os níveis de IL-8 produzidos e os níveis de endotoxinas das amostras do conteúdo gástrico.⁸² Contudo, apesar de um aparente envolvimento do refluxo não ácido na patogénese da asma, poucos estudos têm avaliado o seu papel no epitélio respiratório. Além disso, os constituintes do conteúdo gástrico que têm os efeitos mais deletérios no epitélio respiratório ainda não foram identificados. Isto é, a aspiração de alguns componentes do conteúdo gástrico, como o pepsinogénio, enzimas pancreáticas, sais biliares e componentes microbianos poderão ser determinantes na ocorrência de sintomas respiratórios. Sabe-se que a pepsina é uma enzima que só é activada na presença do ácido do estômago. Recentemente, Bathoorn *et al* demonstraram que a pepsina é citotóxica para células epiteliais brônquicas e que o seu efeito é tanto maior quanto maior for o nível de acidez, conduzindo a dano epitelial e inflamação com envolvimento da libertação de IL-6 e IL-8.⁸³ Contudo, a presença de pepsina pulmonar foi igualmente correlacionada positivamente com a presença de refluxo não ácido.⁸⁴ Um estudo veio revelar que quando células epiteliais da hipofaringe são tratadas com pepsina com pH de 7.4 ocorre a expressão de várias citocinas pro-inflamatórias e receptores, sugerindo que esta enzima digestiva pode estar associada a inflamação do epitélio no decurso de DRGE não ácido em doentes tratados com inibidores da bomba de protões.⁸⁵ Assim, a pepsina pode interagir com as células epiteliais através da endocitose, causando alterações mitocondriais e no complexo de Golgi, assim como interferir com vias envolvidas na expressão de genes que se encontram implicados na toxicidade celular e estas alterações parecem ocorrer mesmo na presença de um pH neutro.⁸⁶

Foi demonstrado que a quantidade de ácidos biliares encontrados nas vias respiratórias de doentes asmáticos com sintomas clínicos de DRGE é significativamente superior comparativamente a doentes asmáticos sem sintomas de DRGE.⁸⁷ Fekri *et al* ao instilar cronicamente solução salina (grupo controlo), suco gástrico, ácido clorídrico ou sais biliares nos pulmões de cobaias verificaram que o número de células epiteliais,

macrófagos, neutrófilos e linfócitos, assim como a concentração de citocinas (IL-1 α , IL-6, TGF- β , TNF- α) do lavado broncoalveolar e do tecido pulmonar foram significativamente superiores comparativamente ao grupo controlo. De referir ainda que a aspiração de sais biliares causou um aumento superior de níveis de citocinas e células inflamatórias comparativamente aos outros componentes do refluxo.⁸⁸ Outros autores vieram demonstrar que complicações pulmonares, como inflamação e fibrose do parênquima pulmonar e bronquíolos causadas pela aspiração crónica de ácidos biliares e pepsina podem ser mais proeminentes do que aquelas decorrentes do refluxo ácido.⁸⁹

O ácido quenodesoxicólico, um ácido biliar não conjugado, parece estimular as células epiteliais das vias aéreas a produzir TGF- β através da activação da via p38 MAP cinase e tal aumento de TGF- β poderá causar um aumento da proliferação de fibroblastos, contribuindo deste modo para a patogénese da fibrose das vias respiratórias.⁸⁷ Com o aumento de citocinas e células inflamatórias pulmonares a aspiração crónica de conteúdo duodenal poderá causar e exacerbar a asma.⁸⁸ Na tentativa de encontrar novas estratégias para combater os processos inflamatórios inerentes à fisiopatologia da asma, recentemente percebeu-se que o ácido quenodesoxicólico, ligando do *Farnesoid X receptor* (FXR), um receptor nuclear com actividade anti-inflamatória e anti-fibrótica⁹⁰, cuja expressão foi encontrada nas células endoteliais pulmonares humanas, ao interagir com este receptor no tecido pulmonar de modelos animais com asma alérgica, pode reduzir significativamente a gravidade da doença.⁹¹ O estudo demonstra ainda que a activação do FXR pode reduzir a inflamação das vias aéreas ao suprimir a libertação de citocinas produzidas por células Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) e TNF- α .⁹¹ Além disso, o ácido ursodesoxicólico produzido em pequenas quantidades em humanos (1 a 3% dos ácidos biliares), parece suprimir a inflamação eosinofílica não só ao nível do trato gastrointestinal, mas também nas vias respiratórias, mais especificamente em doenças com elevado componente eosinofílico como a asma.⁹² Portanto, contrariamente ao referido no passado, os ácidos biliares poderão ser fármacos com potencial de uso em doenças das vias aéreas em humanos, como a asma, o que carece de mais estudos.

Assim, atendendo à importância do refluxo não ácido na patogénese da asma, a monitorização com impedanciometria intraluminal multicanal e pHmetria (Fig. 6) parece assumir um papel crucial

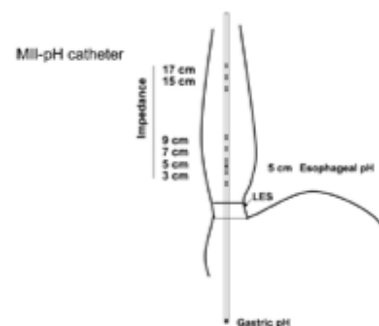


Fig.6 Impedanciometria intraluminal multicanal combinada com pHmetria.

nomeadamente em doentes com sintomas respiratórios persistentes que estão a receber terapêutica com inibidores da bomba de protões.^{31,81} A utilização combinada destas duas técnicas permite documentar uma relação entre o refluxo não ácido e os sintomas respiratórios, de modo a seleccionar os doentes que mais poderão beneficiar de cirurgia anti-refluxo.⁸¹

Asma como causa de refluxo gastro-esofágico

Também deve ser considerada outra perspectiva quando se tenta compreender a relação entre a DRGE e a asma. Actualmente, para o tratamento da asma são utilizados corticosteróides e $\beta 2$ agonistas de curta acção inalados, entre outros. Sabe-se que estes têm um efeito relaxante no músculo liso, diminuindo assim a broncoconstrição e melhorando o fluxo das vias aéreas. Contudo, estes fármacos não são específicos da árvore pulmonar, podendo causar o relaxamento do esfíncter esofágico inferior (EEI) ao serem deglutidos. Lacy *et al* e Crowell *et al* mostraram que o albuterol nebulizado poderá ser um factor responsável pela diminuição da pressão basal do EEI e consequentemente levar à ocorrência de RGE depois da utilização de terapêutica broncodilatadora, nomeadamente em doentes que recebem doses cumulativas.^{93,94} Crowell *et al* acrescentam ainda que o albuterol poderá diminuir a amplitude das contracções esofágicas a 5 cm do EEI e do corpo esofágico.⁹⁴ Um estudo utilizando teofilina mostrou que os sintomas de DRGE aumentavam 170% no grupo tratado comparativamente com o placebo.⁹⁵ De referir ainda, que o tempo de exposição do esófago ao ácido parece estar aumentado no grupo de doentes que recebe prednisolona comparativamente ao placebo, não se conhecendo exactamente qual o mecanismo subjacente.⁹⁶ Estes estudos poderiam deste modo explicar a elevada prevalência de DRGE em doentes asmáticos e por outro lado refutar a hipótese de que é a DRGE a causadora da asma. No entanto, não é possível saber qual dos eventos se deu em primeiro lugar, DRGE ou asma. Poderá mesmo existir um ciclo vicioso entre o uso da medicação asmática, o aumento do RGE e o aumento de sintomas respiratórios que requerem maior uso de medicação. Além disso, apesar destes estudos serem aleatorizados e controlados com placebo, a dimensão das amostras utilizadas é bastante reduzida. Por outro lado, Nordenstedt *et al* vêm demonstrar que, apesar de existir de facto uma associação entre os sintomas de refluxo e os sintomas respiratórios, esta é independente do uso da medicação asmática.²²

Além do efeito da medicação asmática no relaxamento de EEI, a hiperinsuflação pulmonar e a obstrução brônquica existentes durante os episódios de exacerbação poderão contribuir para a ocorrência de RGE. Isto é, durante as exacerbações agudas da asma o aumento da pressão pleural negativa, assim como a descida do diafragma na sequência de hiperinsuflação pulmonar aumentam o gradiente de pressão transdiafragmático, o que por sua vez poderá causar a hernização do EEI para o tórax, diminuindo a sua função de barreira.^{97,98} Neste sentido, Zerbib *et al*, ao tentar determinar o efeito da obstrução brônquica induzida pela metacolina na motilidade do EEI e a ocorrência de RGE, verificaram que não existiam alterações na motilidade do EEI, no pH esofágico e FEV₁ no grupo controlo. Pelo contrário, nos doentes asmáticos a obstrução brônquica diminuiu o FEV₁ em $21.9 \pm 2.6\%$, provocando um aumento da taxa do relaxamento transitório do EEI, o que foi revertido após a inalação de β_2 agonistas. Além disso, o número de episódios de refluxo também aumentou depois da inalação de metacolina. Contudo, este efeito não foi revertido pelo salbutamol, o que se poderá dever ao próprio efeito farmacológico do salbutamol na motilidade do EEI.⁹⁸

Por outro lado, os estudos têm revelado que os doentes asmáticos apresentam uma elevada prevalência de hérnia do hiato, a qual pode servir como reservatório para conteúdo gástrico.^{99,100} Além disso, Mitral *et al* observaram que o relaxamento transitório do EEI foi mais frequentemente seguido de um episódio de refluxo se estivesse presente a hérnia de hiato com ácido retido.¹⁰¹

Outro aspecto a considerar prende-se com a hiperreactividade vagal frequentemente demonstrada nos doentes asmáticos, mais especificamente naqueles com RGE¹⁰², que poderá ser responsável não só pelo reflexo esofago-traqueo-brônquico, mas também por outros factores que poderão predispor ao desenvolvimento de DRGE nos doentes asmáticos, nomeadamente alterações na motilidade esofágica. Amarasi *et al* revelaram que, paralelamente à resposta hipervagal demonstrada por 22 dos 30 doentes asmáticos avaliados, foi observada motilidade esofágica ineficaz em 14 doentes, assim como foi registada menor actividade das ondas peristálticas, mais contracções simultâneas e ainda mais tempo de contacto do ácido com o esófago nos doentes asmáticos com “scores” de sintomas de DRGE mais elevados. De referir ainda, que o tempo de eliminação do ácido foi mais prolongado nos doentes asmáticos do que no grupo controlo.¹⁰³ Ao confirmar-se a correlação entre a hiperreactividade vagal e a motilidade esofágica, poder-se-á pensar que alterações a este nível poderão existir igualmente em doentes asmáticos. Isto é, a hiperreactividade vagal poderá causar um aumento da

secreção ácida e esta por sua vez pode ser responsável pela dismotilidade esofágica, assim como pela diminuição da pressão do EEI. Por outro lado, a dismotilidade esofágica limita a eliminação do ácido, favorecendo o seu contacto com a mucosa esofágica e consequentemente o agravamento da DRGE. No entanto, esta hipótese ainda não se encontra totalmente esclarecida.

Conclusão

Grande parte da evidência disponível defende a existência de dois mecanismos principais subjacentes à relação fisiopatológica entre a DRGE e a asma, a teoria do reflexo vagal e a teoria da microaspiração. Ambos consideram a importância da inflamação neurogénica com libertação de taquicinas e consequente libertação de citocinas pró-inflamatórias, edema e broncoconstrição das vias aéreas, como resultado da estimulação ácida neuronal. Contudo, ainda não é claro se este mecanismo se encontra totalmente dependente de vias colinérgicas.

Estudos recentes, realizados maioritariamente em animais, sugerem que o RGE poderá não só desencadear uma resposta inflamatória semelhante àquela que caracteriza a asma, como também originar um fenótipo distinto da asma alérgica dominado pelo aumento predominante de neutrófilos. Além disso, o envolvimento de ambas as respostas inflamatórias Th2 e Th1 tem sido sugerido, o que carece de mais estudos. Dado o pouco conhecimento sobre os factores associados a asma de início na idade adulta, seria importante, em estudos futuros, perceber se existe uma associação entre o fenótipo referido e este grupo particular de doentes.

O papel do refluxo não ácido tem sido igualmente considerado, com especial destaque para componentes do suco gástrico como a pepsina e os ácidos biliares que parecem induzir uma resposta inflamatória nas vias aéreas. Contudo, a maioria dos ensaios tem-se focado na teoria da microaspiração como mecanismo subjacente para o estudo destes componentes na árvore traqueo-brônquica, não se encontrando definido o papel do refluxo não ácido no reflexo vagal. Novos estudos serão necessários para estabelecer a importância de outros componentes do suco gástrico, como enzimas pancreáticas e componentes microbianos, na asma.

Por outro lado, alterações associadas com a asma que incluem desregulação autonómica, aumento do gradiente de pressão transdiafragmático, uso de medicação para o controlo da asma e aumento da prevalência da hérnia de hiato podem promover o RGE, podendo justificar o aumento da prevalência da DRGE nesta população de doentes.

Contudo, se o RGE é um factor predominante na patogénese da asma ou se apenas constitui uma comorbilidade em adultos asmáticos ainda não se encontra estabelecido, pelo que deverão ser realizados estudos futuros com critérios mais uniformizados e amostras mais alargadas, assim como maior número de ensaios em humanos. A

abordagem de doentes com asma e DRGE permanece desafiante. Uma vez compreendidos os mecanismos fisiopatológicos inerentes à relação destas patologias, novos fármacos ou novas indicações poderão ser desenvolvidos no sentido de um melhor controlo da asma.

Referências Bibliográficas

1. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention Updated. 2015 Available from www.ginasthma.org/
2. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Burden of Asthma. 2004 Available from www.ginasthma.org/
3. Sa-Sousa A, Morais-Almeida M, Azevedo LF, et al. Prevalence of asthma in Portugal - The Portuguese National Asthma Survey. *Clin Transl Allergy*. 2012;2(1):15.
4. ten Brinke A, Sterk PJ, Masclee AAM, et al. Risk factors of frequent exacerbations in difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J*. 2005;26(5):812-818
5. Rath P, Bhatia S, Joshi J, et al. Prevalence of gastro-esophageal reflux disease in patients with difficult to control asthma and effect of proton pump inhibitor therapy on asthma symptoms, reflux symptoms, pulmonary function and requirement for asthma medications. *J Postgrad Med*. 2014;60(3):282.
6. Steppuhn H, Langen U, Scheidt-Nave C, Keil T. Major comorbid conditions in asthma and association with asthma-related hospitalizations and emergency department admissions in adults: results from the German national health telephone interview survey (GEDA) 2010. *BMC Pulm Med*. 2013;13(1):46.
7. Cazzola M, Calzetta L, Bettoncelli G, Novelli L, Cricelli C, Rogliani P. Asthma and comorbid medical illness. *Eur Respir J*. 2011;38(1):42-49.
8. Vakil N, Van Zanten S V., Kahrilas P, et al. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: A global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101(8):1900-20.
9. Natário A, Curado A, Ribeiro A, et al. Rede de Referência Hospitalar de Gastrenterologia Rede de Referência Hospitalar de Gastrenterologia. *ACSS – Adm Cent do Sist Saúde, IP*. 2009:15-49.
10. W. O. The Principles and Practice of Medicine. *Birmingham, AL LB Adams*; . 1892:497-503.
11. Stephen K Field, MD; Margot Underwood, RN;f Rollin Brant, PhD; and Robert L. Cowie M. Prevalence of Gastroesophageal Reflux Symptoms in Asthma. *CHEST J*. 1996;109(2):316-22.
12. Bor S, Kitapcioglu G, Solak ZA, Ertlav M, Erdinc M. Prevalence of gastroesophageal reflux disease in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(2):309-313.
13. Kiljander TO, Laitinen JO. The prevalence of gastroesophageal reflux disease in adult asthmatics. *CHEST J*. 2004;126(5):1490-1494.
14. Havemann BD, Henderson C a, El-Serag HB. The association between gastro-oesophageal reflux disease and asthma: a systematic review. *Gut*. 2007;56(12):1654-1664.
15. Harding SM, Guzzo MR, Richter JE. 24-h Esophageal pH testing in asthmatics: Respiratory symptom correlation with esophageal acid events. *Chest*. 1999;115(3):654-659.

16. Amarasiri LD, Pathmeswaran A, de Silva HJ, Ranasinha CD. Prevalence of gastro-oesophageal reflux disease symptoms and reflux-associated respiratory symptoms in asthma. *BMC Pulm Med*. 2010;10:49.
17. Leggett JJ. Prevalence of gastroesophageal reflux in difficult asthma: relationship to asthma outcome. *CHEST J*. 2005;127(4):1227-1231.
18. Vincent D, Cohen-Jonathan a. M, Leport J, et al. Gastro-oesophageal reflux prevalence and relationship with bronchial reactivity in asthma. *Eur Respir J*. 1997;10(10):2255-2259.
19. Harding SM, Guzzo MR, Richter JE. The prevalence of gastroesophageal reflux in asthma patients without reflux symptoms. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(1):34-39.
20. Yildiz F, Mungan D, Gemicioglu B, et al. Asthma phenotypes in Turkey: a multicenter cross-sectional study in adult asthmatics; PHENOTURK study. *Clin Respir J*. June 2015.
21. Gislason T, Janson C, Vermeire P, et al. Respiratory Symptoms and Nocturnal Gastroesophageal Reflux : A Population-Based Study of Young Adults in Three European Countries. *Chest*. 2002;121(1):158-163.
22. Helena Nordenstedt, PhD; Magnus Nilsson, MD, PhD; Saga Johansson, MD, PhD; Mari-Ann Wallander, PhD; Roar Johnsen, MD, PhD; Kristian Hveem, MD, PhD; and Jesper Lagergren, MD P. The Relation Between Gastroesophageal Reflux and Respiratory Symptoms in a. *Chest*. 2006:1051-1056.
23. Emilsson OI, Bengtsson a., Franklin K a., et al. Nocturnal gastroesophageal reflux, asthma and symptoms of obstructive sleep apnoea: a longitudinal, general population study. *Eur Respir J*. 2012:1347-1354.
24. Littner MR, Leung FW, Ballard ED, Huang B, Samra NK. Effects of 24 weeks of lansoprazole therapy on asthma symptoms, exacerbations, quality of life, and pulmonary function in adult asthmatic patients with acid reflux symptoms. *Chest*. 2005;128(3):1128-1135.
25. Kiljander TO, Harding SM, Field SK, et al. Effects of esomeprazole 40 mg twice daily on asthma: A randomized placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(10):1091-1097.
26. Kiljander TO, Junghard O, Beckman O, Lind T. Effect of esomeprazole 40 mg once or twice daily on asthma: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(10):1042-1048.
27. John G. Mastronarde, Nicholas R. Anthonisen, Mario Castro, Janet T. Holbrook, Frank T. Leone, W. Gerald Teague and RAW. NIH Public Access. 2009;27(5):417-428.
28. Larrain A, Carrasco E, Galleguillos F, Sepulveda R, Pope CE. Medical and surgical treatment of nonallergic asthma associated with gastroesophageal reflux. *Chest*. 1991;99(6):1330-1335.
29. Sontag SJ, O'Connell S, Khandelwal S, et al. Asthmatics with gastroesophageal reflux: long term results of a randomized trial of medical and surgical antireflux therapies. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(5):987-999.

30. Kiljander T, Rantanen T, Kellokumpu I, et al. Comparison of the effects of esomeprazole and fundoplication on airway responsiveness in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Clin Respir J*. 2013;7(3):281-287.
31. Komatsu, Yoshihiro E Al. Proximal Reflux as a Cause of Adult-Onset Asthma. *JAMA Surg*. 2013;148(1):50-58.
32. Susan M. Harding, MD, FCCP; Cathy A. Schon, PA-Cf; Melany R. Guzzo, RN, BSN; Ronald W. Alexander, BA; Laurence A. Bradley, PhD; and Joel E. Richter M, Tion. Gastroesophageal Reflux-Induced Bronchoconstriction. Os Microaspiration a Factor? *CHEST J*. 1995;108(5):1220-7.
33. Wu DN, Tanifuji Y, Kobayashi H, et al. Effects of esophageal acid perfusion on airway hyperresponsiveness in patients with bronchial asthma. *Chest*. 2000;118(6):1553-1556.
34. Amarasiri DL, Pathmeswaran A, de Silva HJ, Ranasinha CD. Response of the airways and autonomic nervous system to acid perfusion of the esophagus in patients with asthma: a laboratory study. *BMC Pulm Med*. 2013;13(1):33.
35. Lars Ib Andersen, MD; Anders Schmidt, Ph.D; and Allan Bundgaard M. Pulmonary Function and Acid Application in the Esophagus. *CHEST J*. 1986; 90(3):358-63.
36. Wright RA, Miller SA, Corsello BF. Acid-induced esophagobronchial-cardiac reflexes in humans. *Gastroenterology*. 1990;99(1):71-73.
37. Araujo a. CS, Aprile LRO, Dantas RO, Terra-Filho J, Vianna EO. Bronchial responsiveness during esophageal acid infusion. *Lung*. 2008;186(2):123-128.
38. Mansfield LE, Hameister HH, Spaulding HS, Smith NJ, Glab N. The role of the vague nerve in airway narrowing caused by intraesophageal hydrochloric acid provocation and esophageal distention. *Ann Allergy*. 1981;47(6):431-434.
39. Hamamoto J, Kohrogi H, Kawano O, et al. Esophageal stimulation by hydrochloric acid causes neurogenic inflammation in the airways in guinea pigs. *J Appl Physiol*. 1997;82(3):738-745.
40. Daoui S, D'Agostino B, Gallelli L, Alt XE, Rossi F, Advenier C. Tachykinins and airway microvascular leakage induced by HCl intra-oesophageal instillation. *Eur Respir J*. 2002;20(2):268-273.
41. Cui Y-Y, Zhu L, Wang H, Advenier C, Chen H-Z, Devillier P. Muscarinic receptors involved in airway vascular leakage induced by experimental gastro-oesophageal reflux. *Life Sci*. 2008;82(17-18):949-955.
42. Profita M, Bonanno A, Siena L, et al. Acetylcholine mediates the release of IL-8 in human bronchial epithelial cells by a NFkB/ERK-dependent mechanism. *Eur J Pharmacol*. 2008;582(1-3):145-153.
43. Cui Y, Devillier P, Kuang X, et al. Tiotropium reduction of lung inflammation in a model of chronic gastro-oesophageal reflux. *Eur Respir J*. 2010;35(6):1370-1376.
44. Ricciardolo FLM, Gaston B, Hunt J. Acid stress in the pathology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(4):610-619.

45. Tsoukali E, Sifrim D. Investigation of extraesophageal gastroesophageal reflux disease. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol*. 2013;26(4):290-295.
46. Mansfield LE, Stein MR. Gastroesophageal reflux and asthma: a possible reflex mechanism. *Ann Allergy*. 1978;41(4):224-226.
47. Patterson RN, Johnston BT, Ardill JES, Heaney LG, McGarvey LP a. Increased tachykinin levels in induced sputum from asthmatic and cough patients with acid reflux. *Thorax*. 2007;62(6):491-495.
48. Kohrogi H, Hamamoto J, Kawano O, et al. The role of substance P release in the lung with esophageal acid. *Am J Med*. 2001;111 Suppl :25S - 30S.
49. Gallelli L, D'Agostino B, Marrocco G, et al. Role of tachykinins in the bronchoconstriction induced by HCl intraesophageal instillation in the rabbit. *Life Sci*. 2003;72(10):1135-1142.
50. Jacoby DB, Costello RM, Fryer AD. Eosinophil recruitment to the airway nerves. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:211-8.
51. Hall AK, Barnes PJ, Meldrum LA, MacLagan J. Facilitation by tachykinins of neurotransmission in guinea-pig pulmonary parasympathetic nerves. *Br J Pharmacol*. 1989;97(1):274-280.
52. Tuchman DN, Boyle JT, Pack AI, et al. Comparison of airway responses following tracheal or esophageal acidification in the cat. *Gastroenterology*. 1984;87(4):872-881.
53. Jack CI, Calverley PM, Donnelly RJ, et al. Simultaneous tracheal and oesophageal pH measurements in asthmatic patients with gastro-oesophageal reflux. *Thorax*. 1995;50(2):201-204.
54. Schan C a., Harding SM, Haile JM, Bradley L a., Richter JE. Gastroesophageal reflux-induced bronchoconstriction: An intraesophageal acid infusion study using state-of-the-art technology. *Chest*. 1994;106(3):731-737.
55. Rosztóczy A, Makk L, Izbéki F, Róka R, Somfay A, Wittmann T. Asthma and gastroesophageal reflux: clinical evaluation of esophago-bronchial reflex and proximal reflux. *Digestion*. 2008;77(3-4):218-224.
56. DiMango E, Holbrook JT, Simpson E, et al. Effects of asymptomatic proximal and distal gastroesophageal reflux on asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(9):809-816.
57. Ricciardolo FL. Mechanisms of citric acid-induced bronchoconstriction. *Am J Med*. 2001;111 Suppl :18S - 24S.
58. Ricciardolo FL, Rado V, Fabbri LM, Sterk PJ, Di Maria GU, Geppetti P. Bronchoconstriction induced by citric acid inhalation in guinea pigs: role of tachykinins, bradykinin, and nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(2):557-562.
59. Cheng Y, Cao A, Zheng J, et al. Airway Hyperresponsiveness Induced by Repeated Esophageal Infusion of HCl in Guinea Pigs. 2014;51:701-708.
60. van Veen IH, ten Brinke A, Gauw S a., Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Consistency of sputum eosinophilia in difficult-to-treat asthma: A 5-year follow-up study. *Jaci*. 2009;124(3):615-617.e2.
61. Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins J V, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am*

Rev Respir Dis. 1988;137(1):62-69.

62. Corren J. Inhibition of Interleukin-5 for the Treatment of Eosinophilic Diseases. *Discov Med.* 2012;13(71):305-312.
63. Peng Q, Matsuda T, Hirst SJ. Signaling pathways regulating interleukin-13-stimulated chemokine release from airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(5):596-603.
64. Yang G, Volk A, Petley T, et al. Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling. *Cytokine.* 2004;28(6):224-232.
65. Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res.* 2001;2(2):66-70.
66. Carpagnano GE, Resta O, Ventura MT, et al. Airway inflammation in subjects with gastro-oesophageal reflux and gastro-oesophageal reflux-related asthma. *J Intern Med.* 2006;259(3):323-331.
67. Sugawa T, Fujiwara Y, Yamagami H, et al. A novel rat model to determine interaction between reflux oesophagitis and bronchial asthma. *Gut.* 2008;57(5):575-581.
68. Li Q, Kong L, Zhang S, et al. A novel external esophageal perfusion model for reflux-associated respiratory symptoms. *Pathobiology.* 2010;77(3):163-168.
69. Barbas a. S, Downing TE, Balsara KR, et al. Chronic aspiration shifts the immune response from Th1 to Th2 in a murine model of asthma. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(8):596-602.
70. Magnan A, van Pee D, Bongrand P, Vervloet D. Alveolar macrophage interleukin (IL)-10 and IL-12 production in atopic asthma. *Allergy.* 1998;53(11):1092-1095.
71. Appel JZ, Lee SM, Hartwig MG, et al. Characterization of the innate immune response to chronic aspiration in a novel rodent model. *Respir Res.* 2007;8(1):87.
72. Thomas AD, Su K-Y, Chang J-C, et al. Gastroesophageal reflux-associated aspiration alters the immune response in asthma. *Surg Endosc.* 2010;24(5):1066-1074.
73. Zhu GC, Gao X, Wang ZG, et al. Experimental study for the mechanism of gastroesophageal-reflux-associated asthma. *Dis Esophagus.* 2014;27(4):318-324.
74. Dal Negro RW, Guerriero M, Micheletto C. Pattern of airway inflammation and remodelling in mild persistent atopic asthma and in mild persistent asthma related to gastroesophageal reflux. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2012;44(6):236-242.
75. Amin K, Lúdvíksdóttir D, Janson C, et al. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(6):2295-2301.
76. Oue K, Mukaisho K, Higo T, et al. Histological examination of the relationship between respiratory disorders and repetitive microaspiration using a rat gastro-duodenal contents reflux model. *Exp Anim.* 2011;60(2):141-150.

77. Lai Y, Wang Z, Ji F, et al. Animal study for airway inflammation triggered by gastroesophageal reflux. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(22):2775-2778.
78. Ekström T, Lindgren BR, Tibbling L. Effects of ranitidine treatment on patients with asthma and a history of gastro-oesophageal reflux: a double blind crossover study. *Thorax*. 1989;44(1):19-23.
79. Littner MR, Leung FW, Ballard ED, Huang B, Samra NK. Effects of 24 weeks of lansoprazole therapy on asthma symptoms, exacerbations, quality of life, and pulmonary function in adult asthmatic patients with acid reflux symptoms. *Chest*. 2005;128(3):1128-1135.
80. Rakita S, Villadolid D, Thomas A, et al. Laparoscopic Nissen fundoplication offers high patient satisfaction with relief of extraesophageal symptoms of gastroesophageal reflux disease. *Am Surg*. 2006;72(3):207-212.
81. Tutuian R, Mainie I, Agrawal A, Adams D, Castell DO. Nonacid reflux in patients with chronic cough on acid-suppressive therapy. *Chest*. 2006;130(2):386-391.
82. Mertens V, Blondeau K, Vanaudenaerde B, et al. Gastric juice from patients “on” acid suppressive therapy can still provoke a significant inflammatory reaction by human bronchial epithelial cells. *J Clin Gastroenterol*. 2010; 44(10):e230-e235.
83. Bathoorn E, Daly P, Gaiser B, et al. Cytotoxicity and induction of inflammation by pepsin in Acid in bronchial epithelial cells. *Int J Inflam*. 2011;2011:569416.
84. Rosen R, Johnston N, Hart K, Khatwa U, Nurko S. The presence of pepsin in the lung and its relationship to pathologic gastro-esophageal reflux. *Neurogastroenterol Motil*. 2012;24(2):129-e85.
85. Samuels TL, Johnston N. Pepsin as a causal agent of inflammation during nonacidic reflux. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;141(5):559-563.
86. Johnston N, Wells CW, Samuels TL, Blumin JH. Rationale for targeting pepsin in the treatment of reflux disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2010;119(8):547-558.
87. Perng D-W. Exposure of Airway Epithelium to Bile Acids Associated With Gastroesophageal Reflux Symptoms *. *CHEST J*. 2007;132(5):1548.
88. Samareh Fekri M, Poursalehi HR, Najafipour H, Shahouza B, Bazargan Harandi N. Chronic aspiration of gastric and duodenal contents and their effects on inflammatory cytokine production in respiratory system of rats. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2014;13(1):40-46.
89. Samareh Fekri M, Poursalehi HR, Najafipour H, et al. Pulmonary complications of gastric fluid and bile salts aspiration, an experimental study in rat. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16(6):790-796.
90. Shaik FB, Prasad DVR, Narala VR. Role of farnesoid X receptor in inflammation and resolution. *Inflamm Res*. 2014;64(1):9-20.
91. Shaik FB, Panati K, Narasimha VR, Narala VR. Chenodeoxycholic acid attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in murine model of asthma by inhibiting the T(H)2 cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;463(4):600-605.

92. Willart M a M, van Nimwegen M, Grefhorst a, et al. Ursodeoxycholic acid suppresses eosinophilic airway inflammation by inhibiting the function of dendritic cells through the nuclear farnesoid X receptor. *Allergy*. 2012;67(12):1501-1510.
93. Lacy BE, Mathis C, Desbiens J, Liu MC. The effects of nebulized albuterol on esophageal function in asthmatic patients. *Dig Dis Sci*. 2008;53(10):2627-2633.
94. Crowell MD, Zayat EN, Lacy BE, Schettler-Duncan a, Liu MC. The effects of an inhaled beta(2)-adrenergic agonist on lower esophageal function: a dose-response study. *Chest*. 2001;120(4):1184-1189.
95. Ekstrom T, Tibbling L. Influence of theophylline on gastro-oesophageal reflux and asthma. *Eur J Clin Pharmacol*. 1988;35(4):353-356.
96. Lazenby JP, Guzzo MR, Harding SM, Patterson PE, Johnson LF, Bradley L a. Oral corticosteroids increase esophageal acid contact times in patients with stable asthma. *Chest*. 2002;121(2):625-634.
97. Choy D, Leung R. Gastro-oesophageal reflux disease and asthma. *Respirology*. 1997;2(3):163-168.
98. Zerbib F, Guisset O, Lamouliatte H, Quinton A, Galmiche JP, Manuel Tunon-De-Lara J. Effects of bronchial obstruction on lower esophageal sphincter motility and gastroesophageal reflux in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(9):1206-1211.
99. Sontag SJ, Schnell TG, Miller TQ, et al. Prevalence of oesophagitis in asthmatics. *Gut*. 1992;33(7):872-876.
100. Mays EE. Intrinsic Asthma in Adults. *JAMA*. 1976;236(23):2626.
101. Mittal RK, Lange RC, McCallum RW. Identification and mechanism of delayed esophageal acid clearance in subjects with hiatus hernia. *Gastroenterology*. 1987;92(1):130-135.
102. Lodi U, Harding SM, Coghlan HC, Guzzo MR, Walker LH. Autonomic regulation in asthmatics with gastroesophageal reflux. *Chest*. 1997;111(1):65-70.
103. Amarasiri DL, Pathmeswaran A, Dassanayake AS, de Silva AP, Ranasinha CD, de Silva HJ. Esophageal motility, vagal function and gastroesophageal reflux in a cohort of adult asthmatics. *BMC Gastroenterol*. 2012;12(1):140.